

苏云金芽孢杆菌沉默基因 *cry2Ab3* 在大肠杆菌中 表达及杀虫活性研究*

陈中义¹ 李长友¹ 刘加宝¹ 张 杰¹ 黄大昉^{1,2**}

(¹ 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100094)

(² 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘 要 对苏云金芽孢杆菌 C002 菌株 *cry2Ab* 基因阳性克隆 pHT315-2Ab 进行亚克隆和序列测定,在 CenBank 注册后经国际 Bt 杀虫蛋白基因委员会正式命名为 *cry2Ab3*。序列分析表明该基因含有芽孢杆菌特异的 RBS 序列,但没有功能性启动子,为沉默基因。根据大肠杆菌 T7 表达载体 pET-21b 克隆位点和 *cry2Ab3* 开放阅读框架(ORF)两端序列,设计合成一对特异引物 L2ab5 和 L2ab3,高保真 PCR 扩增获得 *cry2Ab3* 完整 ORF,经酶切、连接构建了重组表达质粒 pET-2Ab3。表达质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导后,SDS-PAGE 电泳证实了 *cry2Ab3* 的表达。生物测定显示诱导培养物对棉铃虫初孵幼虫和小菜蛾二龄幼虫具有杀虫活性,能明显抑制二化螟二龄幼虫生长,但对甜菜夜蛾和玉米螟没有明显活性。进一步提取 Cry2Ab3 蛋白,生测结果表明其对棉铃虫 LC₅₀ 为 32.55 μg/g。

关键词: 苏云金芽孢杆菌,杀虫晶体蛋白基因,基因表达,杀虫活性

中图分类号: Q939.11 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-6209(2002)05-0561-06

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)是全球应用最广泛最有效的微生物杀虫剂之一。Bt 能够产生多种杀虫蛋白如 Cry 蛋白、Cyt 蛋白,其中 Cry 蛋白为晶体毒素,目前报道的主要有 Cry1~Cry32 等 32 类,它们对昆虫具有特异毒杀作用^[1]。在 Bt *cry* 基因中,有一些没有典型的启动子元件不能有效表达,即所谓沉默基因,分离克隆沉默 *cry* 基因是发掘新的杀虫基因资源的一条有效途径,具有重要的理论和实践意义。

Bt *cry2* 基因有 *cry2Aa*、*cry2Ab*、*cry2Ac* 和 *cry2Ad* 四类,编码约 70kD 蛋白。*cry2Aa* 和 *cry2Ac* 基因具有典型的操纵元结构,*cry2Aa* 基因对鳞翅目和双翅目害虫有活性。*cry2Ab* 为沉默基因^[2],目前国外报道 *cry2Ab1* 和 *cry2Ab2* 基因分别通过与 *cytA*、*cry3Aa* 和 *cry2Aa* 操纵元的启动子融合实现了其在 Bt 无晶体突变株的有效表达,且后者形成了蛋白晶体^[3~6],但目前国内还未见到有关 *cry2Ab* 基因克隆、表达与杀虫活性的研究报道。

本实验室通过 PCR-RFLP 筛选 Bt DNA 文库的方法,从国内 Bt 分离株 C002 中分离克隆了多种 *cry* 基因,其中阳性克隆 pHT315-2Ab 含有 *cry2Ab* 基因。本研究在亚克隆和序列测定基础上,通过大肠杆菌 T7 表达系统实现了 *cry2Ab* 在大肠杆菌的有效表达,并发现该

* 国家转基因植物研究与开发产业化专项课题(J99-A-033)

** 联系人

作者简介:陈中义(1967-),男,安徽宿松人,博士,副研究员,主要从事生防细菌分子生物学与生物安全研究。参加研究工作的还有宋福平等。

收稿日期:2001-11-02,修回日期:2002-04-12

基因对棉铃虫初孵幼虫具有高毒力,能明显抑制二化螟二龄幼虫生长。本研究为新型转基因抗虫植物的研究提供了新的思路和科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株与质粒见表 1。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains & plasmids		Characteristics	Origin
Strains			
Bt HD73	Wild type		This lab
<i>E. coli</i> JM110			This lab
<i>E. coli</i> BL21(DE3)			This lab
<i>E. coli</i> BL21(2Ab3)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	carried pET-2Ab3	This research
Plasmids			
pET-21b	T7 expression vector		This lab
pHT315-2Ab	pHT315	carried <i>cry2Ab</i> gene	This lab
pBluescript KS(-)	<i>E. coli</i> clone vector		This lab
pBlue-2Ab	pBlueScript KS	carried <i>cry2Ab</i> in 3.0kb <i>Eco</i> R I Ifragment	This research
pBlue-2AbEH5	pBlueScript KS	carried <i>cry2Ab</i> 5'- <i>Eco</i> R I / <i>Hinc</i> II fragment	This research
pBlue-2AbEH3	pBlueScript KS	carried <i>cry2Ab</i> 3'- <i>Eco</i> R I / <i>Hinc</i> II fragment	This research
pET-2Ab3	pET-21b	carried <i>cry2Ab</i> full length ORF	This research

1.1.2 供试昆虫 棉铃虫、甜菜夜蛾(*Spodotera exigua*)和亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)标准试虫分别由本所棉铃虫组和玉米螟组提供,二化螟(*Chilo suppressalis*)和小菜蛾(*Plutella xylostella*)为本室饲养。

1.1.3 培养基与试剂 细菌培养基为 LB 培养基。DNA 限制酶、T4 DNA 连接酶购自 Gibcol BRL(LTI)公司, *Bt cry* 基因特异扩增引物由上海生物工程公司合成, *Taq plus* DNA 聚合酶购自上海生物工程公司, 氨苄青霉素购于经科生物工程公司。其它试剂均为市售商品(分析纯)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 分子操作 大肠杆菌质粒提取、DNA 酶切、片段回收和连接及遗传转化采用常规方法 [7]。大肠杆菌转化子的快速检测采用 Kieser 方法 [8]。

1.2.2 DNA 序列分析与大肠杆菌表达载体构建 :DNA 序列测定由大连宝生物工程公司完成, DNA 序列分析采用 DNA Tools5.1 软件。引物由上海生物工程公司合成。

1.2.3 诱导表达与 SDS-PAGE 分析 :活化含重组表达质粒的菌株, 1% 接种 LB 培养液, 37℃ 培养过夜, *cry2Ab* 诱导表达见文献 [7]。蛋白电泳样品快速制备与 SDS-PAGE 电泳见

文献[9]。

1.2.4 室内杀虫生物活性测定 取 10g 人工饲料置一灭菌培养皿中,加入 1mL 待测样品,充分混匀。分别接入棉铃虫、甜菜夜蛾、亚洲玉米螟等供试初孵幼虫,每培养皿 10 头幼虫,每处理重复三次,置于 25℃光照培养箱中,96 小时后调查,以菌液浸泡甘蓝叶片,自然晾干后接入小菜蛾二龄幼虫,25℃~26℃光照培养,48h 和 96h 调查结果。计算校正死亡率、致死中浓度 LC_{50} 。

2 结果和分析

2.1 *cry2Ab3* 亚克隆与序列分析

提取质粒 pHT315-2Ab,限制内切酶消化构建物理图谱,将 *cry2Ab* 基因定位于约 3.0kb *EcoR* I 片段。进一步获得了 *cry2Ab* 基因两个不同方向的克隆 pBlue-2Ab(+)和 pBlue-2Ab(-)及其 5'-和 3'-端的 *Hinc* II 亚克隆 pBlue-2AbEH5、pBlue-2AbEH3(图 1)。测序、拼接获得 *cry2Ab* 全序列,在 GenBank 注册号 AF164666,国际 Bt *cry* 基因命名委员会正式命名 *cry2Ab3*。GenBank 序列比较显示该基因 ORF 序列与 *cry2Ab1* 和 *cry2Ab2* 完全一致,编码 633 个氨基酸,分子量 70.0kD,等电点为 9.11,在 *cry2Ab3* 的 ORF 上游有保守的芽孢杆菌 RBS 序列,但没有芽孢杆菌特异的启动子序列,是沉默基因。

2.2 *cry2Ab3* 在大肠杆菌的诱导表达

为研究 *cry2Ab3* 对我国重要农业害虫的生物活性,我们根据大肠杆菌 T7 表达载体 pET21b 克隆位点设计了一对引物:L2Ab5:CGCGGATCCGATGAATAGTGTATTGAATAGC 和 L2Ab3:CCGGAATTCAAACCTTAATAAAGTGGTG,并在两条引物上分别引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。以 pHT315-2Ab 为模板,用 L2Ab5/L2Ab3 引物扩增获得 *cry2Ab3* 基因 1902bp 的开放读码框(ORF)。*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 PCR 产物和载体 pET-21b,连接转化 JM110,筛选获得 *cry2Ab3* 表达重组质粒 pET-2Ab3,酶切分析结果见图 2。以重组表达质粒 pET-2Ab3 转化大肠杆菌 BL21(DE3),获得工程菌株 BL21(2Ab3)。培养 *E. coli* BL21(2Ab3),0.1mmol/L IPTG 诱导,SDS-PAGE 检测到 60kD 大小的蛋白如图 3。

2.3 *cry2Ab3* 表达产物杀虫活性测定

培养 *E. coli* BL21(2Ab3),以培养物 1:10 比例混合人工饲料或涂叶法,测定对棉铃虫、甜菜夜蛾、亚洲玉米螟、二化螟和小菜蛾幼虫的活性,结果显示对棉铃虫初孵幼虫和小菜蛾二龄幼虫有杀虫活性,能明显抑制二化螟幼虫生长,但对玉米螟和甜菜夜蛾没有活性(表 2)。在此基础上,进一步提取 *Cry2Ab3* 表达产物,SDS-PAGE 定量后按一定的梯度稀释,测定其对棉铃虫初孵幼虫 96 小时的致死中浓度 LC_{50} 为 32.55 μ g/μl 蛋白/饲料重量比)。

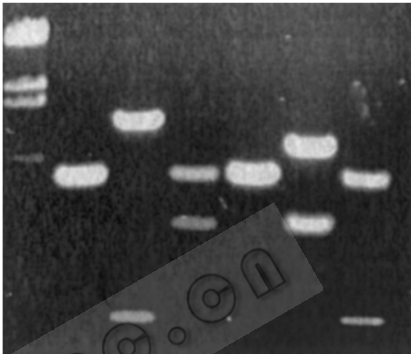


图 1 *cry2Ab3* 基因的亚克隆分析
Fig.1 Analysis of subclones of Bt *cry2Ab3* gene
M. λ Eco130K 19.7.4.6.2.4.2.3.4.2.7.1.9.1.5.0.9kb);
1. pBlue-2Ab(+) γ *Eco*R I;
2. pBlue-2Ab(-) γ *Hinc* II;
3. pBlue-2AbEH5/*Eco*R I + *Hinc* II;
4. pBlue-2Ab(-) γ *Eco*R I;
5. pBlue-2Ab(-) γ *Hinc* II;
6. pBlue-2AbEH3/*Eco*R I + *Hinc* II.

结果见表 3。

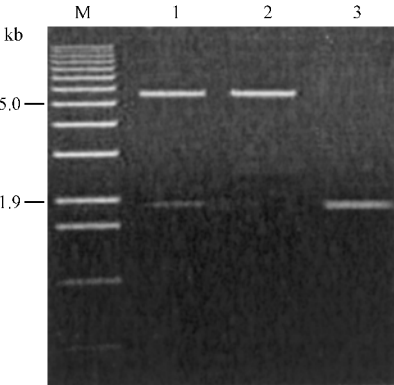


图 2 重组表达质粒限制酶切电泳分析

Fig.2 Ananlysis of expression plasmid pET-2Ab3

1. pET-2Ab3/ *Bam*H I + *Eco*R I ;
2. pET-21b/ *Bam*H I + *Eco*R I ;
3. L2Ab5/L2Ab3 amplified production ;
- M. 1kb DNA Ladder(1 ~ 12kb).

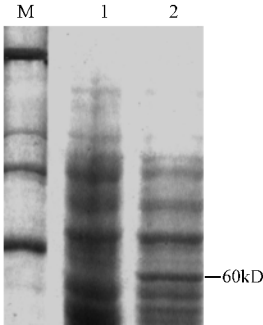


图 3 *cry2Ab3* 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE of BL21 (*cry2Ab3*)

- M :Marker(212 ,116 ,97 ,66kD) ;
1. BL21(DE3) ;
2. BL21(2Ab3).

表 2 *E. coli* BL21(2Ab3)对供试害虫的杀虫生物活性

Table 2 Insecticidal activities against tested insect larvae of *E. coli* BL21(2Ab3)

Treatment	Mortality/ %		Corrected mortality/ %	
	BL21	BL21(2Ab)	BL21(2Ab)	Tested time
<i>H. armigera</i>	8.9	71.1	68.3	7d
<i>P. xylostella</i>	4.4	37.8	34.9	4d
<i>C. suppressalis</i>	0	α (Inhibited)	0	5d
<i>S. exigue</i>	0	No activity	—	7d
<i>O. furnacalis</i>	0	No activity	—	7d

3 讨论

研究表明 *cry2* 基因在苏云金芽孢杆菌中分布广泛 ,目前报道的有 *cry2Aa*、*cry2Ab*、*cry2Ac* 和 *cry2Ad* 四个亚类。本研究报道的 *cry2Ab3* 基因虽然是从我国自行分离的 Bt 菌株 C002 中克隆的 ,但其 ORF 序列与 *cry2Ab1* 和 *cry2Ab2* 完全相同 ,这是因为同一亚群 *cry* 基因高度保守。

沉默基因的表达主要通过基因或启动子融合途径实现。Crickmore 分别通过 *cryA* 启动子和 *cry2Aa* 操纵元启动子的融合实现了 *cry2Ab1* 在 Bt 无晶体突变株的有效表达 ,且后者形成了蛋白晶体^[3]。Dankocsik 等通过与 *cry2Aa* 启动子融合也实现了 *cry2Ab2* 在 *Bt kurstarki* HD73-26 *cry*⁻ 无晶体突变株的高效表达^[4]。本研究通过与 T7 噬菌体启动子的融合构建了 *cry2Ab3* 表达载体 pET-2Ab3 ,并在大肠杆菌 BL21(DE3)通过 IPTG 诱导获得有效

表达 ,在大肠杆菌中表达沉默基因 *cry2Ab* 还未见报道。根据 DNA 序列推导的 *Cry2Ab3* 分子量理论值为 70.7kD ,但 SDS-PAGE 检测到表达产物分子量约为 60 ~ 65kD ,这与 Niel Crickmore 等^[3]、Dankocsik 等^[4]研究结果一致。这种分子量的差异可能是由于 *cry2Ab3* 表达产物被蛋白酶部分降解所致。

对我国重要的鳞翅目害虫的杀虫活性测定发现 *Cry2Ab3* 对棉铃虫(*H. armigera*)也具有高毒力 ,能明显抑制二化螟二龄幼虫的生长。*Cry2Ab3* 对棉铃虫 LC_{50} 为 32.55 μ g/g ,而 Bt HD73 *Cry1Ac* 为 15.2 μ g/g(表 3) ,如果考虑到 *Cry2Ab3* 分子量约为 *Cry1Ac* 的一半(130kD) ,则其毒力约为 *Cry1Ac* 的四分子之一。国外已有研究表明 *Cry2Aa* 对二化螟有高毒力^[10] ,但还未见有关 *Cry2Ab* 的报道。本研究发现 *Cry2Ab* 对二化螟二龄幼虫有很强抑制作用 ,这可能与 *Cry2Ab* 和 *Cry2Aa* 同源性很高有关。但由于受到二化螟虫源和人工饲养技术的限制未能测定 *Cry2Ab3* 对二化螟初孵幼虫和二龄幼虫的毒力水平和体重抑制率 ,相关研究还需进一步深入。

表 3 *Cry2Ab3* 对棉铃虫初孵幼虫毒力测定(96h)

Table 3 Bioassay of *Cry2Ab3* protein against *Helicoverpa armigera* larvae(96h)

Toxic protein	LC_{50} (μ g/g)	95% Confident level(μ g/g)
<i>Cry2Ab3</i>	32.6	16.4 ~ 64.6
HD73(<i>cry1Ac</i>)	15.2	7.4 ~ 31.2

目前研究已经表明 *Cry2A* 与 *Cry1A* 在昆虫中肠作用受体不同 ,这种不同毒素之间的组合有助于增强毒力和预防或延缓害虫对 BT 抗性的发生^[11]。Steward 等研究已经证实转 *cry2Ab2* 和 *cry1Ac* 双价基因的抗虫棉对美洲棉铃虫的毒力明显高于单价 *cry1Ac* 基因抗虫棉^[12]。目前国内转基因抗虫棉和抗虫水稻主要为单价 *cry1A* 类基因 ,基因种类单一。*cry2Ab3* 的克隆及其对棉铃虫和二化螟毒力的发现 ,为构建新型转基因抗虫植物和微生物提供了新的基因和研究思路。

致谢 玉米螟和小菜蛾杀虫生物测定分别是在本所玉米螟组何康来副研究员和本组曹景萍老师指导和支持下完成的 ,本所棉花害虫组提供了棉铃虫、甜菜夜蛾 ,在此一并致以衷心的感谢。

参 考 文 献

[1] Crickmore N ,http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

[2] William R W , Whiteley H R . *J Bacteriol* , 1990 , **172** :2826 ~ 2832.

[3] Crickmore N , Vanessa C , Wheeler D J , et al . *Mol Gen Genet* ,1994 **242** :365 ~ 368.

[4] Dankocsik C , Donovan W P , Jany C S . *Mol Microbiol* , 1990 **4** :2087 ~ 2094.

[5] Adamd W , Niccholls C , Ellar D J . *FEMS Microbiol Lett* , 1989 **59** :197 ~ 202.

[6] Wider W R , Whitely H R . *J Bacteriol* , 1989 , **171** :965 ~ 974.

[7] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . *Molecular cloning :A laboratory maunal* . 2nd ed . New York :Cold Spring Harbor Lab . Press ,1989 .

[8] Kiesser T . *Plasmid* ,1984 ,**12** :12 ~ 36.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [9] 丁之铨 张 杰 黄大方 等 微生物学报 2000 40(6) 573 ~ 578.
- [10] Lee M K , Aguda R M , Cohen M B , et al . *Appl Environ Microbiol* ,1997 63(4) :1453 ~ 1459.
- [11] Schnepf E , Crickmore N , Lereclus D , et al . *Microbiol Mol Biol Rev* ,1998 62(3) :775 ~ 806.
- [12] Steward S D , Adamczyk J J Jr , Knighten K S , et al . *J Econ Entomol* 2001 94 :752 ~ 760.

Expression and Insecticidal Activities Analysis of Silent Gene *cry2Ab3* form *Bacillus thuringiensis* C002 Strain

Chen Zhongyi¹ Li Changyou¹ Liu Jiabao¹ Zhang Jie¹ Huang Dafang^{1 2}

(¹ State Key Lab for Biology of Plant Diseases and Insect Pests , Institute of Plant Protection , CAAS , Beijing 100094 , China)

(² Biotechnology Research Institute , CAAS , Beijing 100081 , China)

Abstract : A *cry2Ab* gene carried on the pHT315-2Ab from C002 strain , Chinese native isolate of Bt was subcloned , sequenced and registered in GenBank , then designated as *cry2Ab3* by the Bt *cry* gene Nomenclature Committee. Sequence analysis revealed that the *cry2Ab3* was a silent gene with the RBS sequence but lack of functional promoter. One pair of PCR primer L2ab5/L2ab3 was designed according to the sequence of *E. coli* T7 phage expression vector pET21b MCS and the *cry2Ab3* ORF. The full ORF sequence was amplified with Taq plus DNA polymerase and inserted into the *Bam*H I / *Eco*R I site of pET21b , and the recombinant expression plasmid was designated as pET-2Ab3. The result of SDS-PAGE analysis proved that Cry2Ab3 was expressed in *E. coli* BL21(DE3) induced by IPTG. Bioassay results showed that *E. coli* BL21(DE3) harbored pET-2Ab3 had insecticidal activities against *H. armigera* 1st larve and *P. xylostella* 2nd instar larvae , the corrected mortality(CM%) was 68.3(7d) and 34.9(4d) respectively ; and strong inhibition to the growth of *C. suppressalis* 2nd star larvae , while no activity against *S. exitera* and *O. furnacalis* . Furthermore , Cry2Ab3 protein was extracted and the LC₅₀ against *H. armigear* was determined as 32.55μg/g.

Key words : *Bacillus thuringiensis* , *cry* genes , Gene expression , Insecticidal activites

重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要 ,扩大作者学术交流渠道 ,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网” ,如作者不同意将文章编入该数据库 ,请在来稿时声明 ,本刊将做适当处理。

从 2000 年开始 ,凡被本刊录用的稿件 ,编辑部将及时发出录用通知 ;对未被录用的稿件 ,将及时函告 ,并说明原因 ,稿件一律不退 ,请作者自留底稿。

《微生物学报》编辑部